第38卷 第4期 昆 虫 学 报 Vol. 38, No. 4
1995 年 11 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1995

粘虫颗粒体病毒的增效因子提高杆状病毒的感染*

丁 翠 邓 塔 蔡秀玉
(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要 一株美洲粘虫 GV (增效品系)在东方粘虫幼虫上进行增殖，所获粘虫 GV (PuGV-Ps)对东方粘虫 NPV(PsNPV)、棉铃虫 NPV(HaNPV) 和黄地老虎 NPV(AsNPV) 进行增效试验。实验结果证明 PuGV-Ps 对三种 NPV 都有明显的增效作用，其中以对 PsNPV 为最强，增效率达 55%—85%;对 HaNPV 为 30%—80%; 而对 AsNPV 只有 15%—35%。用凝胶过滤技术从 PuGV-Ps 中分离增效因子 PuSF-Ps，其对 PsNPV 和 AsNPV 的增效作用亦同样明显,250μg 的 PuSF-Ps 可以提高 PsNPV 的感染能力达 80%。经 Sephader-150 柱(1.6×90)和使用四种标准蛋白(细胞色素 C、胃蛋白酶、牛血清清蛋白和乳酸脱氢酶)测得 PuSF-Ps 的分子量为 160 000 左右。

关键词 粘虫,粘虫颗粒体病毒,增效因子

杆状病毒杀虫剂的应用已成为害虫综合防治的一个重要环节，在一些重要农林害虫防治中起着关键性作用[1]。但因其存在着微生物农药共有的缺点,包括毒力不够高，致死时间过长及大规模工业化生产困难等,在 80 年代后期研制病毒杀虫剂的速度明显减慢。为此，国内外昆虫病毒学家开始在提高病毒毒力及缩短致死时间方面进行更为深入的基础理论研究。1959 年 Tanada[2] 从美洲粘虫 *Pseudaletis unipuncta* 中分离一株 GV (简称 PuGV),对美洲粘虫的 NPV 具有成倍的增效效果,从 PuGV 中提取的增效因子 (SF) 其增效作用更为明显。1989 年我实验室将此株病毒在东方粘虫 *Pseudaletis separata* 的幼虫中进行增殖，获得成功，并把增殖的 PuGV-Ps 与几种重要夜蛾类害虫的 NPV 联合作用,观察其增效效果,现将初步结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫：东方粘虫、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 和黄地老虎 *Agrotis segetum* 系野外(河北省保定地区、山东省徐州地区及天津武清县)采集的虫种，在本实验室用人工饲料[3-5]连续饲养多代的健康幼虫。

1.1.2 病毒：黄地老虎核型多角体病毒 AsNPV、东方粘虫核型多角体病毒 PsNPV、棉

* 国家自然科学基金资助项目。
本文于 1994 年 1 月收到。

铃虫核型多角体病毒 HaNPV 均为本实验室分离保存；美洲粘虫颗粒体病毒 PuGV 由河北省微生物研究所提供(从日本东京农工大学引入)。

1.2 方法

1.2.1 病毒增殖和纯化：用原始 PuGV 感染 2 龄东方粘虫，获病毒致死幼虫，按常规差示离心方法提纯病毒，将初提纯的 PuGV-Ps 置−20℃ 冰箱保存备用。其它病毒的增殖和纯化按上述方法进行。

1.2.2 病毒增效试验：(1) PuGV-Ps 对 HaNPV、PsNPV 和 AsNPV 的增效，按 Hukuhara[6] 的方法配制 PuGV-Ps 病毒悬液，分别与 HaNPV、PsNPV 和 AsNPV 的病毒悬液混合后，加入人工饲料内(每头幼虫 30μl)，24h 后，更换新鲜人工饲料，48h 后检查实验幼虫死亡情况，并以单独 HaNPV、PsNPV 和 AsNPV 感染原寄主的死亡百分率作为对照。每组实验重复 3 次。(2) 病毒增效因子 (PuSF-Ps) 对 AsNPV 和 PsNPV 的增效：增效因子 (PuSF-Ps) 的浓度按 mg/ml 的量配制，接种方法及对照同上。

1.2.3 病毒增效因子 (PuSF-Ps) 的分离及纯化：经 PuGV 感染的死虫研碎后，三层纱布过滤，滤液在离心机上离心 40min，离心速度为 8000r/min，重复离心三次，获灰白色 PuGV-Ps 的粗制品，冰冻干燥后备用。将冰冻干燥的 PuGV-Ps450mg 溶于 150ml 0.02 mol/L NaOH (pH = 10.5) 中 3h(4℃)，在 0.01mol/L(pH = 8) 磷酸缓冲液中透析过夜 (4℃)，28 000r/min (Hitachi 55p-72) 离心 1h，弃沉淀，取上清液，用聚乙二醇 (SIGMA 公司出品) 浓缩至 20ml 左右后上柱，0.01mol/L (pH = 8) 磷酸缓冲液洗脱，分管收集 (3.5ml/管)，在 280nm 波长下测定紫外吸收光密度值(岛津产 UV-120-2 紫外分光光度计)。

1.2.4 增效因子 (PuSF-Ps) 分子量的测定：使用 Sephadex G-150 柱 (1.6cm×90cm) 和细胞色素 C(分子量为 13370)、胃蛋白酶(分子量为 35 000)、牛血清清蛋白 (分子量为 68 000) 及乳酸脱氢酶 (分子量为 136 000) 四种标准蛋白测定增效因子的分子量。以兰色右旋糖酐(分子量为二百万)的洗脱体积为 V_0、上述标准蛋白各自洗脱体积为 V_e，用 V_e/V_0 作横坐标，分子量作纵坐标绘制曲线，从曲线中算出增效因子的分子量。

2 结果与讨论

2.1 PuGV-Ps 的形态和病理特征

用 PuGV 在东方粘虫幼虫上进行增殖后，所获 PuGV-Ps 经扫描电镜观察，其外部形态与原始的 PuGV 相比，无明显区别(图版 I:1,2)。东方粘虫幼虫经 PuGV 感染后的病症有以下特点：(1)病程发展相对缓慢，用 0.2mg/ml 浓度的病毒感染 2 龄幼虫，致死时间为 17—25 天，最长可达 40 天；(2)疾病后期体色由黑色变为乳白(图版 I:3)，死后上皮仍然坚硬；(3)感染率低，2 龄粘虫平均感染死亡率为 20% 以下。

2.2 PuGV-Ps 对 PsNPV、HaNPV 和 AsNPV 的增效效果

使用 0.2 和 0.02mg/ml 浓度的 PuGV-Ps 对三种夜蛾科害虫的 NPV 进行增效试验，发现 PuGV-Ps 对这三种 NPV 都有显著的增效作用，但增效强度不同，以 PuGV-Ps 对 PsNPV 增效最佳，对 HaNPV 的次之，AsNPV 的最差。用百分死亡率计算 PuGV-Ps 对 PsNPV 在 5 龄寄主的死亡率可增加 55%—85% (表 1)；对 HaNPV 的增效可达

表 1　PuGV-Ps 和 PuSF-Ps 对 PsNPV 的增效作用

病毒种类	病毒浓度 (PIBs/ml) (capsules/ml)	4 龄幼虫 试虫总数	4 龄幼虫 死虫数	4 龄幼虫 死亡率 (%)	5 龄幼虫 试虫总数	5 龄幼虫 死虫数	5 龄幼虫 死亡率 (%)	4 龄增效 (%)	5 龄增效 (%)
PsNPV	1.1×10^4	19	1	5.26	20	0	0	—	—
	1.1×10^5	20	1	5.00	20	0	0	—	—
	1.1×10^6	20	4	20.00	20	1	5.00	—	—
	1.1×10^7	20	5	25.00	20	5	25.00	—	—
	1.1×10^8	20	13	65.00	20	8	40.00	—	—
PsNPV + PuGV-Ps	$1.1\times10^4+1\times10^{10}$	20	4	20.00	20	15	75.00	14.74	75.00
	$1.1\times10^5+1\times10^{10}$	20	4	20.00	19	16	84.21	15.00	84.21
	$1.1\times10^6+1\times10^{10}$	20	10	50.00	20	18	90.00	30.00	85.00
	$1.1\times10^7+1\times10^{10}$	13	11	84.62	19	18	94.74	59.62	69.74
	$1.1\times10^8+1\times10^{10}$	18	18	100.00	20	19	95.00	35.00	55.00
PsNPV + P_1^*	$1.1\times10^4+25$	20	18	90.00	—	—	—	84.74	—
	$1.1\times10^5+25$	20	19	95.00	—	—	—	90.00	—
	$1.1\times10^6+25$	20	20	100.00	—	—	—	80.00	—
	$1.1\times10^7+25$	20	20	100.00	—	—	—	75.00	—
	$1.1\times10^8+25$	20	20	100.00	—	—	—	35.00	—
PsNPV + P_2^*	$1.1\times10^4+12.5$	20	13	65.00	20	15	75.00	59.74	75.00
	$1.1\times10^5+12.5$	20	14	70.00	20	16	80.00	65.00	80.00
	$1.1\times10^6+12.5$	20	20	100.00	20	17	85.00	80.00	80.00
	$1.1\times10^7+12.5$	20	20	100.00	20	19	95.00	75.00	70.00
	$1.1\times10^8+12.5$	20	20	100.00	20	19	95.00	35.00	55.00
PuGV-Ps	1.0×10^{10}				48	0	0.00		

注：表 1 的实验结果均为 3 次实验的平均数；P_1^* 的浓度为 25mg/ml；P_2^* 的浓度的浓度为 12.5mg/ml；PsNPV-Ps 的浓度为多角体数/ml(PIBs/ml)；PsNPV-Ps 的浓度为颗粒体数/ml(capsules/ml)。

表 2　PuGV-Ps 对 HaNPV 的增效作用

病毒种类	病毒浓度 (PIBs/ml) (capsules/ml)	5 龄幼虫 试虫总数	5 龄幼虫 死虫数	5 龄幼虫 死亡率 (%)	5 龄增效 (%)
HaNPV	2.0×10^4	60	6	10.00	—
	2.0×10^5	60	12	20.00	—
	2.0×10^6	60	18	30.00	—
	2.0×10^7	60	36	60.00	—
	2.0×10^8	60	42	70.00	—
HaNPV + PuGV-Ps	$2.0\times10^4+1.0\times10^{10}$	60	54	90.00	80.00
	$2.0\times10^5+1.0\times10^{10}$	60	57	95.00	75.00
	$2.0\times10^6+1.0\times10^{10}$	60	60	100.00	70.00
	$2.0\times10^7+1.0\times10^{10}$	60	60	100.00	40.00
	$2.0\times10^8+1.0\times10^{10}$	60	60	100.00	30.00
PuGV-Ps	1.0×10^{10}	60	0	0.00	—

注：表中的实验结果同表 1。PuGV-Ps 的浓度单位为颗粒体/ml。

表 3 PuGV-Ps 和 PuSF-Ps 对 AsNPV 的增效作用

病毒种类	病毒浓度 (PIBs/ml) (capsules/ml)	3 龄幼虫 试虫总数	3 龄幼虫 死虫数	3 龄幼虫 死亡率 (%)	4 龄幼虫 试虫总数	4 龄幼虫 死虫数	4 龄幼虫 死亡率 (%)	3 龄增效 (%)	4 龄增效 (%)
AsNPV	2.16×10^5	60	24	40.00	60	21	35.00		
	2.16×10^6	60	39	65.00	60	36	60.00		
	2.16×10^7	60	54	90.00	60	39	65.00		
	2.16×10^8	60	60	100.00	60	39	65.00		
	2.16×10^9	60	60	100.00	60	42	70.00		
AsNPV + PuGV-Ps	$2.16\times10^5+1\times10^{10}$	60	45	75.00	60	36	60.00	35.00	25.00
	$2.16\times10^6+1\times10^{10}$	60	54	90.00	60	45	75.00	25.00	15.00
	$2.16\times10^7+1\times10^{10}$	60	60	100.00	60	60	100.00	10.00	35.00
	$2.16\times10^8+1\times10^{10}$	60	60	100.00	60	60	100.00	0.00	35.00
	$2.16\times10^9+1\times10^{10}$	60	60	100.00	57	57	100.00	0.00	30.00
AsNPV + P_1^*	$2.16\times10^5+12.5$				54	54	100.00		65.00
	$2.16\times10^6+12.5$				60	60	100.00		40.00
	$2.16\times10^7+12.5$				60	60	100.00		35.00
	$2.16\times10^8+12.5$				60	60	100.00		35.00
	$2.16\times10^9+12.5$				60	60	100.00		30.00
PuGV-Ps	1.0×10^{10}	60	0	0.00	60	0	0.00		

注：表中实验结果同表 1。P_1^* 的浓度为 12.5mg/ml。

表 4 PuGV-Ps 对 PsNPV 的增效效率

龄期	病毒种类和增效效率	死亡率(%) 病毒浓度 (PIBs/ml) 1.1×10^4	1.1×10^5	1.1×10^6	1.1×10^7	1.1×10^8
4 龄	PsNPV	5.26	5.00	20.00	25.00	65.00
	PsNPV + PuGV-Ps	20.00	20.00	50.00	84.62	100.00
	增效效率	3.80	4.00	2.50	3.38	1.54
5 龄	PsNPV	0.00	0.00	5.00	25.00	40.00
	PsNPV + PuGV-Ps	75.00	84.21	90.00	94.74	95.00
	增效效率	75.00	84.21	18.00	3.80	2.30

注：PuGV-Ps 的浓度为 1×10^{10} 颗粒体/ml。

30%—80%(表 2)；而对 AsNPV 的却只有 16.67—37.13%，并所用病毒浓度比前二种高，测试幼虫龄期为 4 龄（表 3)。Harper[7] 曾将在昆虫种群中由二种致死因子引起的死亡现象归总为三种类型：(1)附加效应 (additive effects)，指不显著的效果增长；(2) 增效作用 (synergism)，为效果的显著增长；(3)拮抗作用 (antagonism) 为效果的抵消。PuGV-Ps 对三种 NPV 的增效作用从表 1、2、3 看是十分显著的，以 PuGV-Ps 对 PsNPV 的增效作用为例(表 4)，PuGV-Ps 对 PsNPV 的增效高达 84.21%，最低也达 1.54%，同样 PuSF-Ps 的作用与 PuGV-Ps 相当(表 5)，最高数为 80%。这种比较大幅度的效果提高与 Harper[7] 所提出的增效原则相符，所以上述实验结果证明在东方粘虫上增殖的

表 5　PuSF-Ps(P_7^*) 对 PsNPV 的增效效率

龄期	病毒种类和增效效率	死亡率(%) 病毒浓度 (PIBs/ml)				
		1.1×10^4	1.1×10^5	1.1×10^6	1.1×10^7	1.1×10^8
4 龄	PsNPV	5.26	5.00	20.00	25.00	65.00
	PsNPV + P_7^*	65.00	70.00	100.00	100.00	100.00
	增效效率	12.30	14.00	5.00	4.00	1.54
5 龄	PsNPV	0.00	0.00	5.00	25.00	40.00
	PsNPV + P_7^*	75.00	80.00	85.00	95.00	95.00
	增效效率	75	80.00	17.00	3.80	2.38

注：P_7^* 的浓度为 25mg/ml。

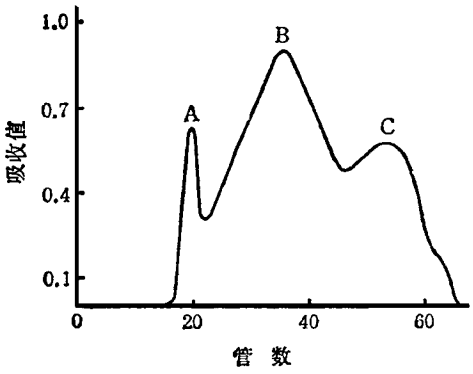


图 1　用 Sephadex G-150 柱 (1.6×90cm) 分离 PuSF-Ps 的洗脱图谱
0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 8) 洗脱，流速为 3.5ml/管，在 280nm 下测量吸收值，样品为 PuGV-Ps 的溶解液。

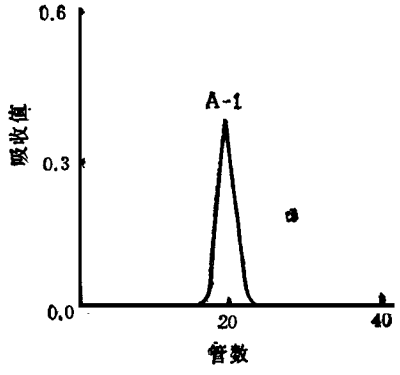


图 2　PuSF-Ps 的第 3 次层析结果(条件同图 1)

PuGV-Ps 对多种夜蛾类的 NPV 具有比较显著的增效作用，并且致死时间亦相应缩短(另文发表)。Hukuhara 也曾用 PuGV 对 PsNPV、Spodoptera litura NPV 和 Bombyx mori NPV 进行增效，其结果以对 PsNPV 为最强，增效指数（用所使浓度的对数表示）可达 4.24，BmNPV 的最低，只有 0.17，其实验结果与昆虫病毒对寄主敏感性的一般规律比较符合，即相同分类地位的寄主间，病毒增效明显，而分类地位不同的增效微弱。

2.3　增效因子的分离纯化及其增效效果

在 0.02mol/L NaOH 溶液中溶解后经 Sephadex G-150 柱层析分离获得三个洗脱峰(图 1)，即 A、

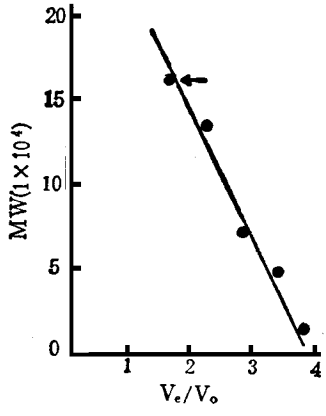


图 3　用 Sephadex G-150 柱 (1.6×90cm) 测量 PuSF-Ps 的分子量
0.01mol/L 磷酸缓冲液洗脱，兰色右旋糖酐的洗脱体积为 V_o。箭头为已测得的 PuSF-Ps 的分子量。

B、C 峰。将A峰收集后用聚乙二醇浓缩，继续用 Sephadex G-150 柱纯化 2 次，最后获得基本上单一的峰(图 2)，将此峰定为 A-1，浓缩后分管贮藏于 −20℃ 冰箱内待用。45 天后用 A-1 组份对 PsNPV 和 AsNPV 进行增效实验，其结果如表 1,3 所示。实验结果证明：组份 A-1 中含有增效因子的成分，峰 B 及峰 C 组份经生测后无增效作用。从表 1,3 看出，不同浓度的 A-1 组分(表中的 P_1^* 和 P_2^*) 对 PsNPV 和 AsNPV 均有明显的增效作用。特别是对 PsNPV，使用 250μg 增效因子可提高效果 80%，最低提高效率为 2.38%。同样浓度的增效因子对 AsNPV 的效率提高就比较差，最高只有 2.86%。

2.4 PuSF-Ps 的分子量

用 Sephadex G-150 柱和四种标准蛋白测出 PuSF-Ps 的分子量约为 160 000 左右(图 3)。Yamamoto[8] 曾经测得 PuSF 的分子量为 126 000 左右，与我们测得的 PuSF-Ps 的分子量有差别。我们认为其原因可能有以下几点：(1)来自不同寄主的增效因子的组成也许不同；(2)在测定时所选用的方法和标准蛋白不同；(3)所提纯的增效因子的纯度亦不相同。

参 考 文 献

1 Huber J. Use of baculoviruses in pest management programs. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. 2, first ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986, 138—179.

2 Tanada Y. Synergism between two viruses of armyworm, *Pseudaletis unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). J. Insect. Pathol, 1959, **1**: 215—231.

3 李秀珍，龚佩瑜，吴坤君. 温度对粘虫生长和食物消耗的影响. 昆虫学报，1992，**33**(3)：301—308.

4 吴坤君. 棉铃虫的人工饲料. 昆虫知识，1980，**17**(1)：36—37.

5 吴坤君，龚佩瑜，李秀珍. 黄地老虎的工人饲料. 昆虫学报，1988，**31**(4)：387—394.

6 Hukuhara T, Tamura K, Zhu Y, *et al*. Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear Polyhedrosis virus infections. Appl. Ent. Zool, 1987, **22**(27): 235—236.

7 Harper J D. Interactions between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides, and parasitoids. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. 2, first ed. Boca Raton, FL: CRC press, 1986, 133—155.

8 Yamamoto Y, Tanada Y. Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a GV of the armyworm, *Pseudaletis unipuncta*. J. Invertebr. Pathol, 1978, **31**: 48—56.

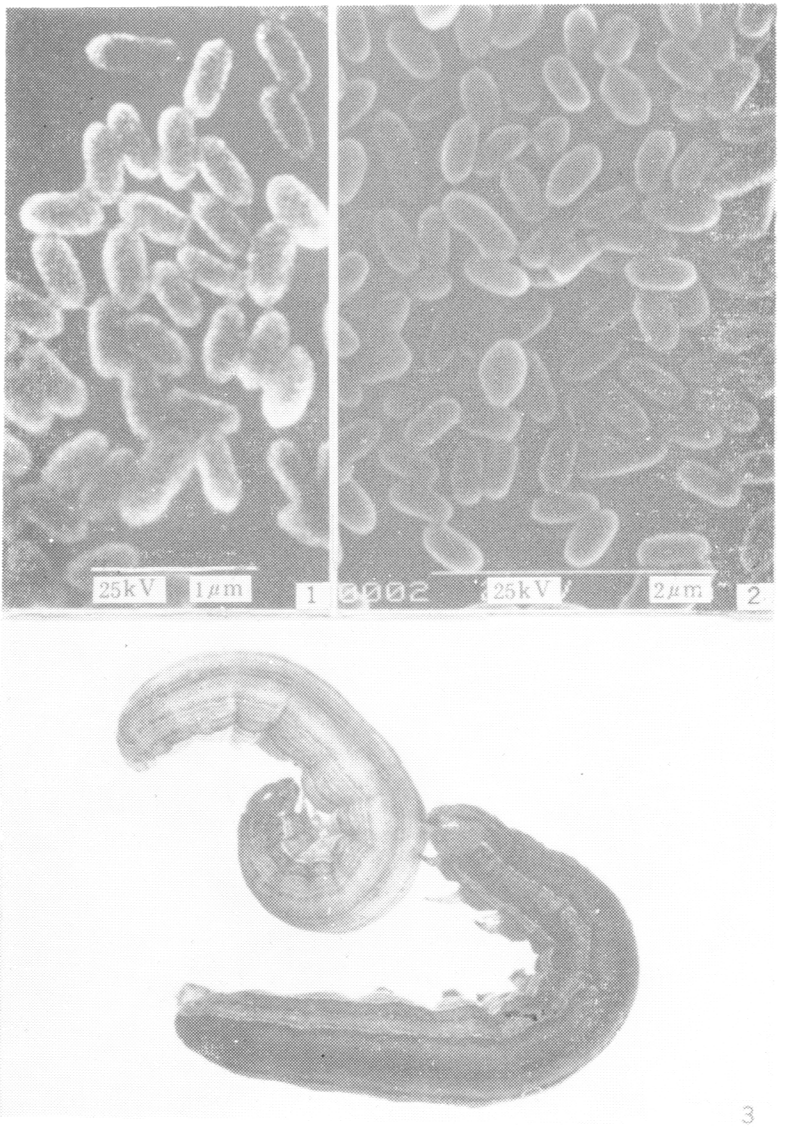
ENHANCEMENT OF BACULOVIRUS INFECTION BY THE SYNERGISTIC FACTOR OF A GRANULOSIS VIRUS OF THE ARMYWORM

Ding Tsuey Deng Ta Tsai Xiuyu

(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)

Abstract We have propagated *Pseudaletis unipuncta* granulosis virus (synergistic strain) in larvae of *Pseudaletis separata* and have conducted quantitative evaluation of the enhancement of the *P. unipuncta* granulosis virus-Ps (PuGV-Ps) on the NPVs of *P. separata* (Ps), *Heliothis armigera* (Ha) and *Agrotis segetum* (As). The results show the PuGV-Ps enhanced PsNPV, HaNPV and AsNPV infections in their original host insects. The high proportions (55%—85%, 30%—80%) of enhancement were observed in the PsNPV and HaNPV assays, and the median one (15%—35%) was obtained in the AsNPV-PsGV system. A synergistic factor (PuSF-Ps) has been isolated from the PuGV-Ps system using gel filtration technique. When PsNPV polyhedra were mixed with 250 ng PuSF-Ps, the value of enhancement increased by about 80%. The molecular weight of the synergistic factor was determined with Sephadex-150 column (1.6cm × 90cm) to be about 160k.

Key words *Pseudaletis separata*, PuGV-Ps, PuSF-Ps



1. PuGV 的扫描电镜图。2. PuGV-Ps 的扫描电镜图。3.东方粘虫幼虫感染 PuGV 后体表颜色的变化，白色为感病幼虫，黑色为健康幼虫。